

植物2C类蛋白磷酸酶及其在逆境信号转导中的作用

陈金焕 夏新莉 尹伟伦

(北京林业大学林木育种国家工程实验室,林木花卉遗传育种教育部重点实验室)

摘要:2C类蛋白磷酸酶(PP2C)是一类丝氨酸/苏氨酸残基蛋白磷酸酶,以单体酶的形式广泛存在于生物体中,参与多种信号途径。大量研究表明,植物PP2C负调控ABA信号转导途径及多种逆境胁迫转导途径。本文对高等植物PP2C的分类及其对多种逆境信号转导途径的调控功能研究进行了综述与展望。

关键词:PP2C蛋白磷酸酶;负调控;逆境信号

中图分类号:Q814 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2010)05-0168-04

CHEN Jin-huan; XIA Xin-li; YIN Wei-lun. **PP2C-type protein phosphatases and their functions in stress signaling.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) 32(5) 168-171 [Ch, 26 ref.] National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

PP2C-type protein phosphatases belong to a family of Ser-Thr protein phosphatases. They are kinds of monomeric enzymes that present in both prokaryotes and eukaryotes. Evidences indicated that PP2C was involved in the negative regulation of ABA signaling and several other stress signaling pathways. Category and the recent progress of PP2C in the regulation of stress signaling transduction pathway in plants were briefly summarized in this paper.

Key words PP2C-type protein phosphatases; negative regulation; stress signaling

由蛋白激酶(protein kinase)和蛋白磷酸酶(protein phosphatase)催化的可逆磷酸化反应是细胞信号转导的重要组成部分,蛋白激酶和蛋白磷酸酶催化蛋白质磷酸化与去磷酸化,这一过程几乎涉及所有的生理及病理过程,如糖代谢、光合作用、细胞的生长发育、基因表达等,在细胞信号转导过程中发挥着重要的调控作用。有关蛋白激酶方面的研究及其成果报道较多,而蛋白磷酸酶方面的研究相对滞后。随着分子生物学研究技术手段的不断成熟与完善,人们对蛋白磷酸酶的认识也不断向深度和广度发展。

1 蛋白磷酸酶的分类

真核生物中的蛋白磷酸酶按照其作用底物特异

性可分为两大类:丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶类(PTPs)和酪氨酸蛋白磷酸酶类(PTPs)。丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶又主要分为PP1和PP2两类。PP1主要作用于磷酸酶激酶的 β 亚单位,对哺乳动物磷酸化酶激酶亚基的去磷酸化活力较高,受内源蛋白抑制物I-1、I-2(inhibitor-1、2)的抑制^[1]。PP2对磷酸化酶激酶 α 亚基的活力较高,且不受I-1、I-2的抑制,PP2的催化亚基可单独存在不需要与固定的调节亚基相结合。但是PP2功能的行使需要在特异的调节亚基的帮助下,在细胞中定位或与特定的作用底物相识别^[2]。按照亚基的结构、活力及是否对二价阳离子存在依赖,PP2进一步分为3个亚类:PP2A、PP2B、PP2C。其中PP2A的活力不依赖于二价阳离子;PP2B的活力依赖于 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$;PP2C

收稿日期:2010-03-22

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD03A01)、国家自然科学基金项目(30730077、30972339)、“863”国家高技术研究发展计划项目(2007AA10Z106)、优秀青年教师科技支撑专项计划项目(YX2010-17)。

第一作者:陈金焕,博士,讲师。主要研究方向:树木分子生物学。电话:010-62336400 Email: chenjh@bjfu.edu.cn 地址:100083北京市清华东路35号北京林业大学69号信箱。

责任作者:夏新莉,博士,教授。主要研究方向:林木抗逆生理。电话:010-62336400 Email: xiaxl@bjfu.edu.cn 地址:同上。尹伟伦,教授,博士生导师,院士。主要研究方向:林木抗逆生理。电话:010-62338080 Email: yinwl@bjfu.edu.cn 地址:100083北京市清华东路35号北京林业大学1号信箱。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

的活力依赖于 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 。根据氨基酸序列及高级结构的不同,丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶又可分为P家族和M家族。PP1、PP2A和PP2B都属于P家族,而PP2C与位于线粒体上的丙酮酸磷酸酶和其他一些丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶组成M家族^[2]。PP2C同其他PSPs相比,最重要的特异性是它缺少调节亚基,是一种单体酶,这使PP2C可以整合到不同的结构中,弥补由于缺少调节亚基而存在的功能缺陷。

2 PP2C在植物中的数量和结构特征

PP2C作为一类具有多种功能的组成型蛋白磷酸酶,在生物体中作为负调节因子广泛参与由逆境胁迫等引起的各种蛋白激酶信号途径。PP2C类蛋白在人类基因组中发现大约有15个,在线虫中有近8个,在果蝇中有10个,酵母菌中仅有7个。在植物中对于PP2C的报道主要集中在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)等草本植物中,Schweighofer等^[3]报道了拟南芥中76个PP2C基因,并将它们分成10个组。Xue等^[4]利用生物信息手段从拟南芥和水稻基因组中分别分离出80和78个PP2C,并分别将它们分为13和11个组。

PP2C的催化区域含有11个保守的结构亚区,这种独特的结构模式赋予了植物中多数PP2C的C-端有保守的催化区域^[5],而N-端则是保守性不强、长度变化不一的延伸型区域,这些延伸型区域决定了PP2C不同的功能^[6]。在独立调节亚基缺失的情况下,植物PP2Cs N-端特有的延伸区域可能在底物识别中起重要作用,同时还可以调节PP2C催化亚基的酶活性。在有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)中发现的激酶互作基序KIM与动物体内发现的一些MAPK激酶(MAPKKs)或者MAPK磷酸酶的基序相似,目前已经几种PP2C类蛋白中被鉴定出来^[7-8]。同样的KIM基序在植物的MAPKK中也被发现,例如,在苜蓿(*Medicago sativa*)MP2C以及大部分的磷酸酶内,PP2C催化结构域与包括KIM的N末端融合在一起^[9]。

3 PP2C参与的植物信号转导途径

作为一个庞大的家族,PP2C通过与一些特定蛋白激酶的对抗实现其对多种信号途径的负调控,PP2C在植物中的分支也说明了生物体内存在复杂的信号机制。不同组的PP2C参与不同的信号调控途径,或者通过不同的方式调控同一信号途径,如A组PP2C为ABA负调控因子,而D组PP2C中则可

能存在ABA正调控因子。

3.1 PP2C参与ABA信号途径

ABA作为植物内源激素在响应干旱、寒冷、高盐等非生物胁迫中具有重要作用,植体内存在大量ABA受体蛋白,通过与ABA的结合和对ABA信号的转换实现ABA对逆境的响应^[10]。对拟南芥PP2C的研究表明,PP2C是ABA信号传递中关键的负性调节因子,拟南芥中有16个PP2C基因受ABA诱导表达,其中A组9个成员全部受ABA诱导表达,并且其中至少有5个成员已被证实对ABA信号转导途径具有负调控功能^[4,11]。ABI1和ABI2是拟南芥中2个编码PP2C的基因,它们的蛋白质氨基酸序列具有较高的同源性,二者包含核心区域的C端区域86%同源,不保守的N-端区域也有48%的同源性。ABI1和ABI2隐形突变损伤在种子萌发上对ABA更敏感,因此ABI1和ABI2被鉴定为PP2C成员中ABA信号途径的负调控因子;此外,PP2C成员中还有另外3个成员PP2CA、HAB1、HAB2在ABA信号途径中起负调控作用^[3]。PP2C能够通过接触使ABA信号的正调节因子SnRK2(SNF1-相关激酶2)发生去磷酸化作用而失活^[12]。Ma等^[10]发现ABI1/ABI2能够与植物体内的RCAR蛋白相互作用,发生依赖于ABA的失活反应,进而削弱其对ABA信号的负调控作用,RCAR/PYR/PYL可能是ABA受体。Melcher等^[13]确认了PYL2-ABA-PP2C复合物的晶体结构,提出了PP2C能够作为co-receptor促进ABA与PYR/PYL的结合,因此PP2C/PYL可能是ABA的真正受体。hab1-1、abi1-2双突变能够提高植物的抗旱性,过表达HAB则导致植株抗旱性减弱,说明PP2C在拟南芥逆境响应中为负调控^[14]。PP2C对ABA信号的正调控仅在山毛榉(*Fagus sylvatica*)中有报道,山毛榉中至少存在2个PP2C成员,其中FsPP2C1与ABI1、ABI2具有很高的同源性,超表达FsPP2C1的转基因拟南芥种子对ABA不敏感,其萌发不受ABA抑制,表明FsPP2C1对ABA信号途径是负调控^[15]。而超表达FsPP2C2的拟南芥植株则表现出对ABA及渗透胁迫信号的敏感上升,转基因植株出现矮化和花期推迟等现象,并且ABA响应基因RAB18的转录水平明显提高,因此它是ABA信号途径的正调控因子,经研究FsPP2C2参与了GA合成,说明PP2C可以参与植物体内多种信号途径^[16]。

3.2 PP2C参与调控钾通道蛋白

酵母实验表明,A组PP2C蛋白基因AtPP2CA能够通过其催化亚基与钾通道蛋白基因AKT2/AKT3结合^[17-18]。AtPP2CA和AKT2均在微管组织

中表达且均受到ABA诱导,由于AKT2控制K⁺内向通道,推测*AtPP2CA*通过调节AKT2控制逆境胁迫状态和微管运输中的K⁺通道和膜极性。此外,PP2C成员*AIP1*还能与AKT1结合在CBL-CIPK-AKT信号途径中起作用^[19]。CBL(钙调磷酸酶B类蛋白)是从拟南芥中分离的一组Ca²⁺感应蛋白,通过与一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶CIPK(CBL-结合蛋白激酶)相互作用,调节钾离子通道蛋白AKT1的活性。大量研究表明,CBL-CIPK信号转导网络在环境信号中起重要作用,拟南芥中至少有4个CBL和3个CIPK,可以组成12种不同的CBL-CIPK,每一种都能够激活钾通道蛋白基因AKT1。推测AIP1对AKT1的去磷酸化作用和CIPK对AKT1的磷酸化作用共同决定了AKT1通道蛋白的活性。因AIP1同时还能与CIPK23结合,也可能AIP1、CIPK23和AKT1先形成复合体,然后根据激酶/磷酸酶相对活性调节CBL-CIPK-AKT信号系统的开闭,在胁迫转导信号中扮演角色^[19]。

3.3 PP2C负调控MAPK植物创伤信号途径

通过对不同植物中PP2C蛋白基因家族的研究,发现该家族成员在MAPK创伤信号途径中发挥着重要作用,其作用主要体现在对MAPK蛋白的去磷酸化上。从苜蓿cDNA文库中筛选到的*MP2C*是一个参与MAPK信号途径的PP2C类基因,直接作用于MAPK途径中的SIMK(胁迫诱导MAPK),*MP2C*通过对SIMK中pTEpY序列的苏氨酸残基去磷酸化使SIMK途径失活,在SIMK途径中起负调控作用^[9,20]。研究表明,拟南芥PP2C家族的*AP2C1*同样在MAPK途径中发挥着重要作用。*AP2C1*是一个新发现的植物体内的胁迫信号调节因子,它的作用是使应激型的MAPK蛋白MPK4和MPK6失活,进而引起乙烯合成量降低,致使植物体创伤信号途径被削弱,最终导致植物体的免疫力下降^[21],因此它与*MP2C*一样在MAPK途径中起负调控作用。而*AP2C1*突变体在受到创伤时能够产生大量的茉莉酸,同时对病虫还具有较强的抵抗力,这进一步说明*AP2C1*能够通过MAPK途径负调控植物对外界损害的响应^[22]。

3.4 PP2C参与植物抗病害信号途径

植物在遭受病害时,会产生类似活性氧(ROS)、水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)、乙烯(ET)等化学物质作为信号分子,并通过相应的信号转导途径激活相关基因的表达。PP2C作为植物体内较大的一类蛋白磷酸酶家族,在植物抗病信号途径转导上同样发挥着重要作用^[23]。*OsBIPP2C2*是从水稻cDNA文库里筛选到的新型的PP2C家族基因,它编码380个

氨基酸,包括PP2C的全部11个保守催化区域。苯并噻二唑(BTH)能够显著诱导*BIPP2C2*的表达。另外,*BIPP2C2*在转基因烟草中的过量表达提高了其对烟草花叶病毒和疫霉病菌的抵抗力。更为重要的是研究发现*OsBIPP2C2*过量表达型转基因烟草的防卫基因能够稳定表达,这说明*BIPP2C2*在植物的抵抗病毒侵害的防御机制中发挥着重要作用^[24]。

*NtPP2C1*是从烟草中得到的一个PP2C家族基因。根据以往的研究,该基因能够在干旱胁迫下强势表达,但是会在氧化胁迫和热激的条件下被抑制^[17]。最新的研究发现,*NtPP2C1*同ROS的生产系统之间存在着直接的联系。研究者使用RNA印迹分析的方法,发现在隐地蛋白处理下,转*NtPP2C1*基因的烟草细胞中ROS的合成量显著降低,表明*NtPP2C1*对*NtrbohD*有负调控作用,说明PP2C对于信号通路的干预与ROS的合成是紧密联系的,同时PP2C家族还有可能对细胞内的氧化还原平衡同样起调控作用^[25]。

4 展望

PP2C作为一大类重要的蛋白磷酸酶,通过催化底物蛋白的去磷酸化反应,调控植物逆境信号途径,而植物体内PP2C的多样性则表明不同的组织和器官中信号转导机制的多样性。最近,研究者们发现PP2C除了负调控ABA信号外,还可能和PYL家族的成员结合共同作为ABA受体,这使得PP2C的作用机制更为复杂。

过去针对PP2C的研究,主要是通过体外实验的方法来实现,比如蛋白重组、酵母杂交,只能对酶的功能及作用底物等信息进行基本的定义和推测,没有实现基于细胞学的功能验证。现在,通过目标蛋白在拟南芥悬浮细胞原生质体中的短暂表达,可以直接从原生质体中提取蛋白质对PP2C酶活性进行直接测试,研究PP2C在活细胞内的作用。这种体内研究系统对分析细胞内活性酶的合成、酶的作用底物以及相关的酶促反应等具有重要意义,也为今后对新的PP2C家族成员的研究提供了研究方法^[26]。随着现代生物技术的飞速发展,如T-DNA插入突变体分析、RNA干涉技术、DNA微阵列技术以及蛋白质组学的应用,PP2C的底物和作用机制以及在植物中的功能将得到全面解析。

参考文献

- [1] SMITH R, WALKER J. Plant protein phosphatases [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1996, 47: 101-125.
 [2] COHEN P. The structure and regulation of protein phosphatases [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1989, 58: 453-508.

- [3] SCHWEIGHOFER A, HIRT H, MESKIENE I. Plant PP2C phosphatases: Emerging functions in stress signaling [J]. *Trends in Plant Sciences*, 2004, 9: 236-243.
- [4] XUE T T, WANG D, ZHANG S Z, et al. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis* [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 550.
- [5] BORK P, BROWN N, HEGYI H, et al. The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: Detection of bacterial homologues [J]. *Protein Science*, 1996, 5: 1421-1425.
- [6] HUBBARD M, COHEN P. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1993, 18: 172.
- [7] STONE J, WALKER J. Plant protein kinase families and signal transduction [J]. *Plant Physiology*, 1995, 108: 451.
- [8] LI C, HU Y, MAYR M, et al. Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 25273-25280.
- [9] MESKIENE I, BGRE L, GLASER W, et al. MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(4): 1938-1943.
- [10] MA Y, SZOSTKIEWICZ I, KORTE A, et al. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1064-1068.
- [11] WASILEWSKA A, VLAD F, SIRICHANDRA C, et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more [J]. *Molecular Plant*, 2008, 1(2): 198-217.
- [12] FUJI H, CHINNUSAMY V, RODRIGUES A, et al. *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway [J]. *Nature*, 2009, 462: 660-664.
- [13] MELCHER K, NG L M, ZHOU X E, et al. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors [J]. *Nature*, 2009, 462: 602-608.
- [14] SANTIAGO J, RODRIGUES A, SAEZ A, et al. Modulation of drought resistance by the abscisic acid-receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs [J]. *The Plant Journal*, 2009, 60(4): 575-588.
- [15] GONZALEZ-GARCIA M, RODRIGUEZ D, NICOLAS C, et al. Negative regulation of abscisic acid signaling by the *Fagus sylvatica* FsPP2C1 plays a role in seed dormancy regulation and promotion of seed germination [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133: 135-144.
- [16] REYES D, RODRIGUEZ D, GONZALEZ-GARCIA M, et al. Overexpression of a protein phosphatase 2C from beech seeds in *Arabidopsis* shows phenotypes related to abscisic acid responses and gibberellin biosynthesis [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141: 1414-1424.
- [17] VRANOVA E, INZE D, VAN BREUSEGEM F. Signal transduction during oxidative stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1227-1236.
- [18] CHEREL I, MICHARD E, PLATET N, et al. Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K⁺ channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA [J]. *The Plant Cell*, 2002, 14: 1133-1146.
- [19] LEE S, LAN W, KIM B, et al. A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(40): 15959-15964.
- [20] ZHANG T, LIU Y, YANG T, et al. Diverse signals converge at MAPK cascades in plant [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44(5-6): 274-283.
- [21] ECKARDT N. Phosphatase AP2C1 is a key component of MAPK signaling in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 2098.
- [22] SCHWEIGHOFER A, KAZANAVICIUTE V, SCHEIKL E, et al. The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 2213-2224.
- [23] SCHWEIGHOFER A, IS I. Protein phosphatases in plant growth signalling pathways [C]// BOGRE L, BEEMSTER G T S. *Plant cell monographs: Plant growth signaling*. Berlin: Springer, 2008: 277-300.
- [24] HU X, ZHANG H, LI G, et al. Ectopic expression of a rice protein phosphatase 2C gene OsBIPP2C2 in tobacco improves disease resistance [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(6): 985-995.
- [25] ELMAYAN T, SIMON-PLAS F. Regulation of plant NADPH oxidase [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2007, 2(6): 505-507.
- [26] SCHWEIGHOFER A, AYATOLLAHI Z, MESKIEN I. Phosphatase activities analyzed by *in vivo* expressions [C]// PFANNSCHMIDT T. *Methods in molecular biology: Plant signal transduction*. New York: Humana Press, 2009: 1-14.

(责任编辑 董晓燕)